Aus der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
o. Lehrstuhl und Abteilung Innere Medizin II
(Vorstand: Prof. Dr. med. H.D.Waller)

KOMBINIERTE AUTORADIOGRAPHISCHE UND FEULGENPHOTOMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN AN LEUKÄMIEZELLEN UNTER BEHANDLUNG MIT CYTOSIN–ARABINOSID, HYDROXYUREA UND METHOTREXAT

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Josef Glatthaar
aus Oberndorf/Neckar

1974

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546514_0098

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
o. Lehrstuhl und Abteilung Innere Medizin II
(Vorstand: Prof. Dr. med. H.D.Waller)

KOMBINIERTE AUTORADIOGRAPHISCHE UND FEULGENPHOTOMETRISCHE UNTERSUCHUNGEN AN LEUKÄMIEZELLEN UNTER BEHANDLUNG MIT CYTOSIN–ARABINOSID, HYDROXYUREA UND METHOTREXAT

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Josef Glatthaar
aus Oberndorf/Neckar

1974

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan	:	Prof. Dr. E. Körber
1. Berichterstatter	:	Priv. Doz. Dr. D. Müller
		Prof. Dr. H. D. Waller
2. Berichterstatter	:	Priv. Doz. Dr. M. F. Rajewsky

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

A EINLEITUNG 1

B METHODIK 3

Kombinierte autoradiographische und feulgenphotometrische Untersuchungstechnik

1. Autoradiographie
2. Festhalten von markierten Zellen anhand von Lageskizzen
3. Auswaschung der grains und anschließende Feulgenfärbung
4. Feulgen-Zytophotometrie
   Wiederfinden der markierten Zellen
5. Kritik an der Methode

C BESPRECHUNG DER VERWANDTEN ANTIMETABOLITE 11

1. Cytosin-arabinosid
2. Methotrexat
3. Hydroxyurea

D FALLBESPRECHUNG 18

E ERGEBNISSE 25

I. Unter Therapie mit Cytosin-arabinosid

1. ^{3}H-Thymidinmarkierungsindex
2. Verteilung der DNS-synthetisierenden Zellen innerhalb der S-Phase

a) Dem.J.
b) Dai.H.
c) Geh.H.

II. Unter Therapie mit Hydroxyurea und Cytosin-arabinosid

III. Unter Therapie mit Methotrexat

F DISKUSSION 37

I. Cytosin-arabinosid
II. Hydroxyurea und Cytosin-arabinosid
III. Methotrexat

G ZUSAMMENFASSUNG 43

H LITERATURVERZEICHNIS 45

A. EINLEITUNG

Schon mehrere Jahre ist bekannt, daß auch innerhalb von leukämischen Zellpopulationen, welche morphologisch einheitlich sind, sich 2 Fraktionen unterscheiden lassen, eine proliferierende Fraktion und eine nicht proliferierende Fraktion (20,15). Die ersteren werden auch Zykluszellen genannt, die zweiten sind die G_o-Zellen.

Zytostatika vermögen nur diese Zykluszellen zu erfassen und in ihrer Zellteilung zu hemmen, während die G_o-Zellen unbeeinflusst bleiben, da ihr Kernstoffwechsel und ihre Mitoseaktivität erloschen sind. Die S-Phasen-spezifischen Zytostatika, zu denen auch die Antimetabolite gehören, schädigen auf Grund ihrer biochemischen Angriffspunkte nur solche Zellen, die sich in der S-Phase des Zellzyklus befinden. Cytosin-arabinosid (Ara-C) ist ein Vertreter dieser Gruppe.

Wie schon mehrfach beobachtet wurde, kommt es nach der Ara-C Injektion unter anderem zu einem Abfall des ^{3}H-Thymidinmarkierungsindex (35,17). Das ist ein Ausdruck dafür, daß die Zellen in ihrer DNS-Synthese gehemmt sind. Lampkin et al (17) beobachtete 2 Tage nach der Ara-C Gabe wieder ein Ansteigen dieses ^{3}H-Thymidinindex und vermutet eine partielle Synchronisation der leukämischen Zellpopulation unter dem Einfluß von Ara-C. Es soll nun in der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob nach der Ara-C Gabe der ^{3}H-Thymidinindex sehr bald wieder zunimmt.

Wenn das der Fall ist, erhebt sich die Frage, wodurch dieser Wiederanstieg des ^{3}H-Thymidinindex bedingt ist. Sind es Zellen, die nach der DNS-Synthesehemmung durch Ara-C ihre Synthese wiederaufnehmen oder sind es vornehmlich Zellen, die nach der Ara-C Gabe vermehrt aus der G_1 in die S-Phase eintreten? Dies sollte mit Hilfe einer kombinierten autoradiographischen und feulgenphotometrischen Technik entschieden werden.

Weiter erhofft man sich einen Hinweis darauf, ob Ara-C selektiv in einem bestimmten Teil der S-Phase angreift.

Zum Vergleich soll die Wirkung des Methotrexat herangezogen werden.

Eine Erschwernis für eine wirksame Zytostatikatherapie stellt die asynchrone Teilung der Leukämiezellen dar. Die Zellen teilen sich zu verschiedenen Zeitpunkten, sodass bei der kurzen Halbwertszeit der meisten Zytostatika nur ein kleiner Teil der Leukämiezellen in der empfindlichen S-Phase getroffen wird (12). Mit Hydroxyurea wird nun versucht, die Zellen an der G_1-S Grenze zu arretieren und anschließend synchron in die S-Phase eintreten zu lassen (26).

Läßt sich diese Synchronisation mit Hydroxyurea ausnutzen für eine sich anschliessende wirksamere Ara-C Therapie? Auch das soll diskutiert werden.

B METHODIK

Kombinierte autoradiographische und feulgenphotometrische Untersuchungstechnik

Die Kombination von Autoradiographie und Feulgenphotometrie an derselben Zelle erlaubt uns, den DNS-Gehalt von denjenigen Zellen zu bestimmen, die gerade DNS synthetisieren, also sich gerade in der DNS-Synthese-Phase des Zellzyklus befinden. Man gewinnt so eine Vorstellung über die Verteilung der S-Phasezellen innerhalb der DNS-Synthesephase. Hierzu werden zunächst Autoradiogramme von Leukämiezellen angefertigt; die markierten in der DNS-Synthesephase befindlichen Zellen werden festgehalten anhand von Lageskizzen. Nach Auswaschung der grains schließt sich eine Feulgenfärbung zur semi-quantitativen DNS-Messung mit Hilfe der Feulgenphotometrie (21) an. Die Identifikation der einzelnen markierten Zellen geschieht durch Vergleich der Lageskizzen mit dem mikroskopischen Bild in der Feulgenfärbung.

1. Autoradiographie nach ^{3}H-Thymidin-Inkubation

   Durch in vitro-Inkubation von Blut mit ^{3}H-Thymidin werden Aussagen darüber gewonnen, welche Zellen sich in diesem Zeitraum in ihrer DNS-Synthesephase befinden und wie hoch ihr prozentualer Anteil innerhalb einer Zellpopulation ist. Der ^{3}H-Thymidin-Markierungsindex gibt in unserem Fall an, wieviel ‰ der leukämischen Blasten im peripheren Blut sich in DNS-Synthese befinden, oder anders gesagt, auf wie viele Zellen sich die DNS-Neubildung verteilt. Unter Katalyse durch die Thymidinkinase wird das radioaktiv markierte Thymidin phosphoryliert zu TMP (Thymidinmonophosphat) und nach weiterer Phosphorylierung zu TTP (Thymidintriphosphat) in die DNS der Zellkerne eingebaut, die während der kurzzeitigen Inkubation gerade in der DNS-Synthese-Phase sind. (6,24,32).

   Hier ist die Tritiumaktivität durch die Technik der

Einzel-Zellautoradiographie nachweisbar. Da Tritium als ß-Strahler nur eine Reichweite von 1µ besitzt, liegen in den Autoradiogrammen die meisten Körner im Zellkern und nur wenige im Cytoplasma. Die Untersuchungen wurden nach einer früher angegebenen Methode durchgeführt. (3):

5 ml Blut läßt man in ein Röhrchen tropfen, welches o,5 ml Dextran (1o%)- Glukose (5%)-Lösung, o,5 ml Kochsalzlösung 1,4%, 2 Tropfen Heparin (Liquemin^{R}) und 3µ $C^{3}H$-Thymidin enthält. Bei 37^{o}C erfolgt eine 45-minütige Inkubation. Nach Zentrifugation, 800 U/min 10 Min. lang, werden aus dem Rückstand dünne Ausstriche gemacht und im Mikroskop kontrolliert, ob die Zellen gleichmäßig verteilt sind. Mit Methanol fixiert man 1o Min. lang und läßt lufttrocknen. Die fixierten Ausstriche werden nach der 'dipping-film' Methode weiter verarbeitet. Man taucht sie hierzu in eine Filmemulsion (der Fa.Ilford, England), die bei schwachem Rotlicht u. 45^{o}C so dünnflüssig angesetzt wird, daß sie an einem eingetauchten Glasstab noch haften bleibt.

In der Dunkelkammer exponiert man die Präparate 7 Tage lang und entwickelt danach 15 Min. bei absoluter Dunkelheit mit einem Gemisch, das folgendermaßen hergestellt wird (Ansatz für 10 Präparate): Aqua dest.400 ml, 1,8g Amidol, 7,2g Na_2SO_3, 3,2 ml 10% kBr. Anschließend wird 35 Min. mit Natriumthiosulfatlösung (300 ml gesättigte Na-thiosulfatlösung und 600 ml H_2O) fixiert und 30 Min. gewässert.

Als letzter Schritt kommt die Färbung nach Giemsa bei einem pH von ca. 5,1, 2 x 20 min. Pufferlösung ist ein Gemisch aus 85 ml Citronensäurelösung O,1 molar,115 ml Dinatriumphosphatlösung O,2 molar, und 800 ml H_2O. Auf 10 ml Pufferlösung gibt man 40 Tropfen Giemsalösung (~1,2ml).

2. Festhalten von ^{3}H-Thymidin markierten Zellen anhand von Lageskizzen

Damit der DNS-Gehalt der sich in DNS-Synthesephase befinlichen Zellen gemessen werden kann, müssen diese S-Phase-Zellen markiert werden. Dies geschah wie eben beschrieben mit ^{3}H-Thymidin (^{3}HT). Weiterhin ist notwendig, diese S-Phase-Zellen auf dem Präparat festzuhalten, da bei der Präparation der Autoradiogramme für die DNS-Messung mit der Feulgenphotometrie die markierenden grains herausgewaschen werden. Hierfür legten wir für jede ^{3}HT-markierte Leukämiezelle eine Lageskizze an und numerierten sie. Die Präparatstelle hielten wir mit Hilfe der Noniusskala eines Kreuztisches fest, der auf dem Objektdrehtisch befestigt wurde. Benutzt wurde bereits hier das Mikroskop (Objektiv 32 fach) des Mikrospektralphotometers (UMSPI, Fa.Zeiss), mit dem hinterher die DNS-Messungen durchgeführt wurden. Feststellknopf und die beiden Zentrierknöpfe für den Objektdrehtisch waren immer in gleicher Stellung. Die Hilfsbeleuchtung gestattete ein Arbeiten in polychromatischem Licht und damit eine bessere Differenzierung der grains als in monochromatischem Licht. Festgehalten wurde jede markierte Leukämiezelle, die mindestens 6 grains enthielt (mit Ausnahme eines Patienten mit geringerer grain-Zahl: hier wurden 4 grains als Abgrenzung gegenüber dem background gewählt), und die genügend weit entfernt von Nachbarzellen lag, sodaß sie bei der photometrischen Messung zugänglich war. 30-60 Zellen pro Autoradiogramm (einmal 21) wurden so erfaßt, je nachdem wie hoch der ^{3}HT-Markierungsindex lag oder wie die Zelldichte war. Die Grenzen der Methodik wurden durch die Höhe des $^{3}_{H}$-Thymidinindex bestimmt, der nach Zytostatikagabe noch weiter absank. Um bei einem ^{3}HT-Index zum Beispiel von o,3‰ 45 markierte Zellen zu erfassen, mussten 15o ooo Leukämiezellen durchge-

mustert werden.
Als Immersionsöl wird für die Quarzglasoptik des UMSP Glycerin benötigt. Um Beschädigungen der Filmemulsion auf den Autoradiogrammen durch Glycerin zu vermeiden, wurden die Autoradiogramme mit einem Deckglas abgedeckt.

3. Auswaschung der grains aus den Autoradiogrammen und anschließende Feulgenfärbung

a) Auswaschung der grains:
Um den Kern-DNS-Gehalt der ^{3}H-Thymidin-markierten Zellen messen zu können, müssen die bei der Cytophotometrie störenden grains vor der Feulgenfärbung herausgewaschen werden. Die Autoradiogramme wurden hierzu folgendermaßen behandelt:

1. 15 Min. 7,5% Kaliumferricyanidlösung
2. 3 x 5 Min. 24% Natriumthiosulfatlösung
3. 15 Min. fließend Leitungswasser

b) Anschließende Feulgenfärbung

Mit der Feulgenfärbung (9) läßt sich die DNS spezifisch anfärben. Grundlegend für die Feulgenreaktion ist, daß schwache Säuren die N-glykosidische Bindung zwischen Purinkörper und Desoxyribose im DNS-Molekül hydrolytisch aufspalten, und daß dabei wiederum das Halbacetal der 2-Desoxyribose entsteht. Dieses ist im Gegensatz zur Ribose und den anderen Monosacchariden in der Lage, wie ein Aldehyd mit der farblosen fuchsinschwefligen Säure (Schiff'sches Reagenz) zu reagieren. Dabei ergibt sich eine rotgefärbte Verbindung. (19)

Die sonst bei der Feulgenfärbung übliche Fixierung in Alkohol kann hier unterbleiben, da die Präparate bereits nach Giemsa vorgefärbt waren.

1. 12 Min.Hydrolyse bei 60° in 1-n HCl-Bad
2. Schnelles Abtupfen der Präparate auf Zellstoff, ohne dabei die Präparate abkühlen zu lassen.
3. 1 Std. Schiff'sches Reagenz (Herstellung (Müller) (22): 0,5g Pararosanilin in 15 ml 1-n HCl lösen, 0,5g Kaliummetabisulfit in 85 ml Aqua dest. lösen und zusetzen. Nach 24 Std. filtrieren und im Dunkeln aufbewahren.)
4. Abtupfen auf Zellstoff
5. 3 x 10 Min. Spülflüssigkeit (jedesmal frisch herstellen: 1g Kaliummetabisulfit wird in 20 ml 1-n HCl gelöst, dazu werden 360 ml H_2O gegeben.)
6. 5 min. Aqua dest.
7. Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe
   2 Min. 70% Alkohol
   3 Min. 85% Alkohol
   2 x 3 Min. absoluter Alkohol
8. 3 Min. Xylol
9. Eindecken in Caedax (n=1,55)

Nach der Färbung wurden die Präparate im Dunkeln aufbewahrt und jeweils innerhalb von 2 Wochen gemessen.

4. Feulgen-Zytophotometrie zur semiquantitativen DNS-Bestimmung

1936 entwickelte Caspersson (4) eine Methode, um an Zellausstrichen quantitative photometrische Nucleinsäurebestimmungen durchzuführen. Die Zellkerne erscheinen im UV-Bereich bei 260 mμ dunkel infolge der hohen Eigenabsorption der Nucleinsäuren bei dieser Wellenlänge. Durch eine fortlaufende Absorptionsmessung über allen Arealen der Zelle, gelingt es, den Gehalt an Nucleinsäuren in einer Größenordnung von 10^{-12}g zu erfassen.

Im Prinzip genügt dabei folgender apparative Aufbau:

Lichtquelle, Monochromotor und, an Stelle der Cuvette für Absorptionsmessungen an Lösungen, ein Mikroskop mit dem zu untersuchenden Zellausstrich, sowie ein Photomultiplier zur Messung des im Untersuchungspräparat nicht absorbierten Lichtes. Für die Untersuchungen im UV-Licht muß aber die gesamte Optik, einschließlich Objektträger aus Quarzglas bestehen.

Die Tatsache, dass im UV-Licht DNS und RNS in gleicher Weise absorbieren und die Manipulationen zur Entfernung der grains unübersehbare UV-Absorptionsänderungen hervorrufen würden, führte dazu, die DNS mit der unten beschriebenen Feulgenfärbung darzustellen. Diese Feulgenfärbung ist spezifisch für die DNS und erlaubt einen semiquantitativen Nachweis der DNS. (2,7,9,29). Ihre maximale Absorption liegt im sichtbaren Bereich bei 560 mμ.

Die photometrischen Messungen wurden mit dem automatisch registrierenden Universal-Mikro-Spektralphotometer (UMSPI der Fa. Zeiss, Oberkochen) vorgenommen. Die Einzelzelle wird von einem Meßstrahl mäanderförmig abgesucht. Dabei bewegt sich nicht der Meßstrahl, sondern der Objekttisch. Die Tischbewegungen werden von dem digitalen Schnellmeßzusatz XD 50, der mit dem UMSPI gekuppelt ist, gesteuert. Ebenso von dem Schnellmeßzusatz werden die Meßwerte als Extinktion angegeben. Die Feststellung der Gesamtextinktion eines Meßfeldes geschieht automatisch in dem Schnellmeßzusatz. Diese Gesamtextinktion ist der Feulgenfärbung und damit dem DNS-Gehalt proportional. Alle Messungen erfolgten unter folgenden Bedingungen:

Am UMSP: Wellenlänge 560 mμ,
Objektiv 100 fach, NA 1,25
Glyzerinimmersion, Leuchtfeldblende 2,5 mμ in Objektebene.

Am Schnellmeßzusatz:

Dämpfungsstufe 1, Schwellenwert o,o5, Schrittweite bei mäanderförmiger Absuchung 1µ, Zeilenlänge bei der mäanderförmigen Absuchung: 10-22 mµ, je nach Größe der Zelle.

Wiederfinden der ^{3}HT-markierten Zellen

Mit Hilfe der Noniusskala des Kreuztisches, welcher für das UMSP eigens angefertigt werden mußte, werden die Präparatestellen wiedereingestellt, von denen zuvor eine Lageskizze gemacht worden ist. Wegen des größeren Gesichtsfeldes wird das Objektiv, 32 fach, benutzt. Es wird nun das mikroskopische Bild in der Feulgenfärbung verglichen mit der Aufzeichnung der Präparatestelle, an der im Autoradiogramm eine markierte Zelle lag. Bei genauer Übereinstimmung von mikroskopischem Bild und Aufzeichnung kann die ehemals markierte Zelle mit Sicherheit wiedergefunden werden. Wenn die beiden Bilder nicht identisch waren, wurde die Präparatestelle verworfen.

Das war in wenigen Fällen nötig, bei denen beim Färbevorgang aus irgendeinem Grunde einige Zellen weggeschwemmt wurden.
Außerdem mußte man darauf achten, daß der Feststellknopf für die Objekttischdrehung und die beiden Zentrierknöpfe für den Drehtisch die gleiche Stellung einnahmen wie beim Aufzeichnen der Autoradiogramme.

In der Nachbarschaft fast jeder markierten Zelle wurde eine Leukämiezelle mitgemessen, von der man aus den Lageskizzen wußte, daß sie unmarkiert ist.

5. Kritik an der Methode

1. In den Autoradiogrammen war es zum Teil schwierig, eine Zelle als markiert anzusprechen oder nicht, weil der Hintergrund nicht sauber genug war. Wir bezeichneten eine Zelle als markiert,wenn

sie mindestens 6 grains über dem Kern hatte. Nur bei einem Patienten, bei dem die Hintergrundsaktivität ebenso wie die Gesamtgrainzahl über den Zellen niedrig war, genügten uns 4 grains.

2. Infolge der Auswaschung der grains aus den Präparaten war die Anfärbung der Zellen schwächer als bei einer Standard-Feulgenfärbung. Auch waren die Präparate unterschiedlich gefärbt. Aus diesem Grunde haben wir bei der DNS-Messung in jedem Präparat eine Anzahl von nichtmarkierten Zellen mitgemessen, um den 2c-DNS-Gehalt in jedem Präparat zu erhalten. Die 2c-Werte der Präparate von demselben Patienten wurden in den Abbildungen direkt untereinander gesetzt und die Werte darüber oder darunter auf diesen konstanten 2c-Wert umgerechnet.

3. Um einer möglichen unterschiedlichen Anfärbung der Zellen auf demselben Präparat zu begegnen, wurde in der Nachbarschaft fast jeder markierten Zelle eine unmarkierte Leukämische Zelle mitgemessen. So erreichte man, daß der gewonnene 2c-Wert repräsentativ für die gemessenen markierten Blasten war.

4. Eine Verwechslung von markierten mit nichtmarkierten Zellen im Feulgenpräparat war bei der DNS-Messung ausgeschlossen. Bei dem Vergleich von Lageskizze und mikroskopischem Bild im UMSP konnte man gut entscheiden, ob es sich um dieselbe markiert gewesene Zelle handelte.

C BESPRECHUNG DER VERWANDTEN ANTIMETABOLITE

Die in der Behandlung von Tumoren und Leukämien eingesetzten Antimetabolite sind dadurch wirksam, dass sie verschiedene Reaktionen der DNS-Synthese hemmen. Infolge ihrer chemischen Ähnlichkeit zu natürlichen Substraten oder Co-Faktoren verdrängen sie diese kompetitiv von ihren Bindungsstellen an Enzymproteinen, und wirken so als Enzyminhibitor (34). Zufuhr von Metaboliten von aussen kann daher die Wirkung der Antimetaboliten aufheben. Verschiedene Antimetabolite können auch weiter verstoffwechselt, in dieser Form als falsche Nucleotide in die DNS oder RNS eingebaut werden und somit die DNS-Synthese proliferierender Zellen stören (18). Damit möglichst viele proliferierende Zellen in der DNS-Synthesephase geschädigt werden, muss die intrazelluläre Konzentration so hoch sein, dass der Enzymblock für die Dauer der DNS - Reduplikation anhält.

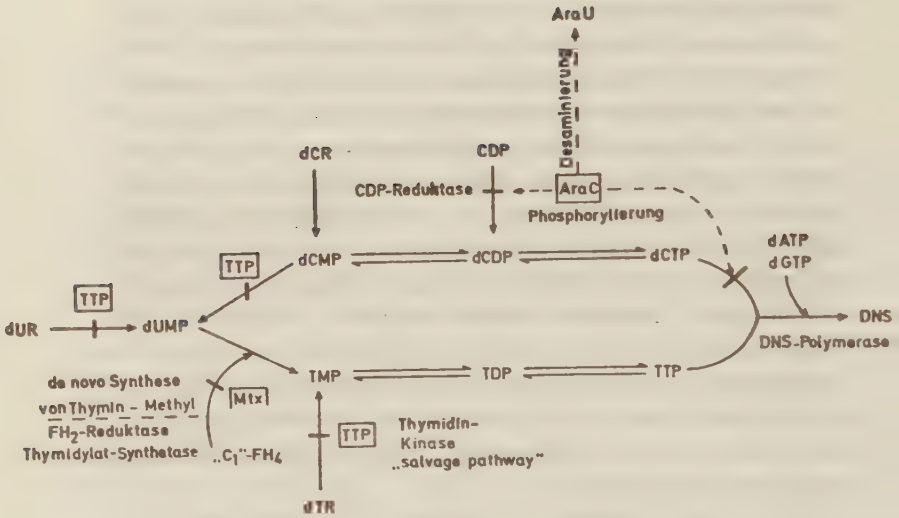

Abb.1

Schematische Darstellung der DNS-Synthese, ihrer Regulation durch Thymidintriphosphat und der Angriffspunkte von Methotrexat, und Cytosin-Arabinosid. dCR Desoxycytidin;dUR Desoxyuridin; dTR Thymidin; dCMP,dCDP,dCTP Desoxycytidin-mono, die-, triphosphat; TMP, TDP,TTP Thymidin-mono-, di-, triphosphat; dUMP Desoxyuridinmonophosphat; CDP Cytidinphosphat; dATP, dGTP Desoxyadenosin- und -guanosin-triphosphat; FH_2 Dihydrofolat; FH_4,Tetrahydrofolat; "C_1" Einkohlenstoffeinheit; Mtx Methotrexat; Ara C Cytosin-Arabinosid; Ara U Uracil-Arabinosid.

Herrn Prof.Wilmanns danke ich für die Überlassung der Abbildung (publiziert in (34)).

Wie aus der schematischen Übersicht (Abb.1) ersichtlich ist, (34) erfolgt die für die DNS-Verdopplung wichtige Thymidylatsynthese (TMP) auf zweierlei Wegen:

1. Durch die Methylierung von Desoxyuridinmonophosphat (dUMP), welches über den "de novo-Syntheseweg" gebildet wird, unter Beteiligung der Enzyme Dihydrofolat-Reductase und Thymidylat-Synthethase.

2. Durch die Phosphorylierung von Thymidin mittels der Thymidinkinase.

Der erstgenannte Weg ist der physiologisch bedeutsamere. Der zweite hat mehr die Funktion eines Ersatzstoffwechsels. Dieser wird durch den Hemmeffekt von Thymidintriphosphat (TTP) auf die Thymidinkinase im Sinne einer negativen Rückkoppelung reguliert (13, 33).

Die Angriffspunkte der bei unseren Patienten verwendeten Antimetabolite Cytosin-arabinosid und Methotrexat sind in Abb.1 wiedergegeben.

1. Cytosin-Arabinosid

Der Pyrimidinantagonist Cytosin-arabinosid (Ara-C)ist ein Derivat des Pyrimidinnucleosids Cytidin. Nach Phosphorylierung zum Diphosphat hemmt er die DNS-Synthese durch Blockierung der Reduktion von Cytidindiphosphat zum Desoxycytidindiphosphat (5). Das Triphosphat von Ara-C ist ein wirksamer Inhibitor der DNS-Polymerase(1o) Eine Verminderung der Thymidintriphosphatbildung infolge Hemmung der Reduktion von CDP (siehe Abb.1) führt zu einem Fortfall der negativen Rückkoppelung von TTP auf die Thymidinkinase. Ein häufig beobachteter Anstieg der Thymidinkinase ist die Folge (37). Eine gewisse Rolle dabei dürfte ausserdem eine partielle Synchronisation der leukämischen Zellpopulation in der DNS-Synthesepha-

se spielen (34).

Bereits kurz nach Ara-C Injektion kommt es zu einer Abnahme der Einbauraten sowohl von ^{3}H-Thymidin als auch von ^{3}H-Desoxyuridin, zu einem vorübergehenden Anstieg der Thymidinkinase bei Erniedrigung der DNS-Polymerase (34) und zu einem Abfall des ^{3}H-Thymidin-markierungsindex (35). Am 3. Tag ist die Leukocytenzahl deutlich reduziert.

In der Leber wird Ara-C durch Desaminierung zum Uracilarabinosid rasch inaktiviert und innerhalb von 24 Stunden werden 9o% davon im Urin ausgeschieden (37).

Das Medikament wird bei akuten Leukämien zur Remissionseinleitung bis zu einer Dauer von 6-1o Tagen 2 mal täglich in einer Dosierung von 1,5 mg/kg Körpergewicht intravenös injiziert (34).

Zur Zeit wird geprüft, ob sich die mit Ara-C erreichten therapeutischen Resultate durch eine Kombination mit 6-Thioguanin, einem Purinderivat, verbessern lassen (34). Dieses wird peroral 6 Stunden nach Ara-C Gabe verabreicht.

Da RNS- und Proteinsynthese weiter in den durch Ara-C gehemmten Zellen erfolgen, kommt es zu einem starken zytoplasmatischen Wachstum der Zellen und damit zu einer megaloblastären Markumwandlung. Weiter entsteht eine Leuko- und eine Thrombopenie (37). Alle Toxischen (u.therapeutischen) Effekte können durch gleichzeitige Gabe von Desoxycytidin aufgehoben werden.

2. Methotrexat

Der Folsäureantagonist Methotrexat (Amethopterin) ähnelt chemisch der Folsäure. Er hemmt die Thymidylat- und DNS-Synthese durch Hemmung der Dihydrofolat (FH_2-) Reductase auf Grund einer festen Bindung an das Enzymprotein (Abb.1)

Diese Enzymblockierung kann kompensiert werden durch eine Neuinduktion von FH_2-Reductase im Verlauf eines Zellzyklus. Die Antimetabolitkonzentration muss deshalb so hoch sein, dass sie die FH_2-Reductase während des ganzen Zellzyklus hemmt (34).

Durch diese Blockierung der Thyminmethylgruppen-de novo-Synthese hemmt Methotrexat den Einbau von Desoxyuridin. Thymidin wird dagegen vermehrt für die DNS-Synthese verwertet, was sich durch den Fortfall des negativen Rückkoppelungsmechanismus von TTP auf die Thymidinkinase erklären läßt. Es wird also ein Ansteigen der Thymidinkinaseaktivität beobachtet (36).

Die Ausscheidung von Methotrexat erfolgt unverändert durch die Nieren, innerhalb von 24 Stunden zwischen 5o und 8o% der applizierten Dosis.

Die Dosierung von Methotrexat bei Erwachsenen ist o,5-1 mg/kg Körpergewicht, 1-2 mal wöchentlich i.v. injiziert (34). Eine Modifizierung ist die Kombination von Methotrexat mit seinem Antidot Citrovorumfaktor. Der Citrovorumfaktor wird im Anschluss an eine Methotrexatinfusion gegeben und hat die Aufgabe, die toxischen Hemmeffekte an normalen Zellen aufzuheben.

Wie bei Ara-C kommt es auch bei dem Folsäureantagonist zu megaloblastären Umwandlungen der Erythropoese im Knochenmark, zu einer Leukopenie, Thrombopenie und Anämie. Besonders gefürchtet sind Nekrosen der Schleimhäute, vorallem in Mund, Rachen, Magen und Darm.

3. Hydroxyurea

Der Antimetabolit Hydroxyurea ist ein Hydroxyderivat des Harnstoffes. Er blockiert die DNS-Synthese durch Hemmung des Enzyms Ribonucleosiddiphosphat-Reductase, welches Ribonucleotide in Desoxyribonucleotide über-

führt, und so die Desoxyribosidbausteine für die DNS bereitstellt (16,38,39). Dabei scheint nur die Bildung der Purinnucleotide, also die Bildung von Desoxyguanosindiphosphat (dGDP) und Desoxyadenosindiphosphat (dADP), unterbunden zu werden (31). Auch wird die Möglichkeit diskutiert, daß nicht Hydroxyurea selbst, sondern unbekannte Stoffwechselprodukte von ihm die DNS-Synthesehemmung bewirken (3o).

Der Einbau von ^{3}H-Thymidin ist dabei stark vermindert. Der noch verbleibende Einbau von ^{3}H-Thymidin soll nicht auf eine kleine Zellfraktion mit unbeeinflußter DNS-Synthese zurückzuführen sein, sondern auf einer bleibenden niedrigen Einbaurate aller Zellen beruhen, die sich in der S-Phase befinden.(27)

Auffällig an Hydroxyurea ist seine synchronisierende Wirkung auf proliferierende Zellen (8,25,28). Die Hemmung der DNS-Synthese ist nur vorübergehend. Fällt die Konzentration von Hydroxyurea unter einen bestimmten Wert ab, dann wird der DNS-Syntheseblock sehr rasch aufgehoben. Die Einbaurate von ^{3}H-Thymidin nimmt stark zu (26, 27).

Ermöglicht wird die angenähert synchrone Reversibilität des Hydroxyureablocks durch seine kurze Halbwertszeit im Organismus. Ungefähr 8o% werden innerhalb von 12 Stunden im Urin ausgeschieden, nach 24 Stunden ist im Blut nichts mehr nachweisbar (11).

Dauert der Hydroxyureablock nur kürzere Zeit, dann scheinen sowohl die blockierten S-Phasezellen als auch die an der G_1-S -Grenze angehäuften Zellen ohne nennenswerten Schaden die DNS-Synthese wiederaufzunehmen. Dauert der Block hingegen über längere Zeit, dann haben die blockierten S-Phasenzellen die Fähigkeit verloren, DNS weiter zu bilden, während die an der G_1-S Grenze ange-

häuften Zellen ungeschädigt die DNS-Synthese aufnehmen und die S-Phase sogar beschleunigt durchlaufen (23,26).

Indiziert ist Hydroxyurea bei akuten Leukämien bei dem Versuch durch Synchronisation der proliferierenden Zellen die Wirksamkeit einer sich anschließenden zytostatischen Therapie zu erhöhen. Es wird, oral gegeben, schnell aus dem Magen-Darm resorbiert. Nach 2 Stunden ist die maximale Plasmakonzentration erreicht (11).

Als Nebenwirkungen treten wie bei Ara-C und Methotrexat megaloblastäre Markumwandlungen auf, da RNS- und Proteinsynthese nicht gehemmt werden, weiter Leukopenie und Anämie.

D FALLBESPRECHUNG

Wir führten autoradiographische und feulgenphotometrische Messungen durch unter der Therapie von:

1. Cytosin-arabinosid bei 4 Kranken (Dem J.: Lymphoblastenleukämie, Dai.H.,: akute undifferenzierte Leukämie, Geh.H.: Myeloblastenleukämie, Bau.Eu.: akute Promyelocytenleukämie)
2. Hydroxyurea und Cytosin-arabinosid bei 1 Kranken Böt.G.: akute Promyelocytenleukämie) und
3. Methotrexat bei einem Kranken (Bar.Er.: lymphoidzelliger Retikulose).

1. Dem.J., 45 Jahre, ♂: Lymphoblastenleukämie

3 Monate vor Aufnahme in die Med.Klinik verspürte der Patient plötzlich Schluckbeschwerden. Der Hals schwoll stark an. Anschliessend bestanden starke Schmerzen hauptsächlich nach den Mahlzeiten im Bereich der ganzen Speiseröhre und im Epigastrium.

Befund bei Klinikaufnahme:
Leber und Milz nicht tastbar. Lymphknoten tastbar kirschgroß links inguinal und rechts axillär. Leuko 55oo, Blasten 96%, Hb 9,2% Ery 2,3 Mill., Thrombo 45 ooo. Sternalpunktat: R/W stark erniedrigt (5/1oo), Blasten 95%.

Unter einer 1-wöchigen Therapie mit Ultralan und 5 Tage nach einer einmaligen Gabe von Vincristin 3 mg, stiegen die Leukocyten auf 195 ooo. Mit der Kombination Cytosin-arabinosid (2x1oo mg/d) und 6-Thioguanin (16o mg/d) vermochte man dann innerhalb von vier Tagen die Leukocyten von 159 6oo auf 27 4oo zu senken. Zu einer Besserung des Differentialblutbildes kam es dabei nicht. (96 vor und 94% Blasten nach Cytosin-arabi-

nosid) 2 1/2 Wochen nach Klinikaufnahme verstarb der Patient, nachdem es am ganzen Körper zu einer hämorrhagischen Diathese gekommen war.

2. Dai.H., 39 Jahre, ♂: Akute undifferenzierte Leukämie

Nachdem der Patient in einem auswärtigen Krankenhaus 3 Monate behandelt worden war, wurde in der Med.Klinik die Diagnose akute undifferenzierte Leukämie gestellt. Peripherer Blastenanteil 54%. Sternalpunktat: R/W stark erniedrigt (5/1oo), Blasten 27%.

Die folgende 3-monatige Klinikbehandlung, zunächst mit Vincristin 3 mg, dann mit Puri-Nethol (1oo mg/d) und Decortin (1omg/d), vermochte keine Remission herbeizuführen, das subjektive Befinden des Patienten war jedoch gut. Eine erneute Aufnahme in die Med. Klinik nach kurzzeitiger Entlassung erfolgte wegen heftiger Kopfschmerzen.

Befund bei Wiederaufnahme:
Leber 14 cm breit, Milz nicht tastbar, Lymphknoten vergrößert an Hals und Leisten. Leuko 1o 3oo, Blasten 89%, Ery 1,2 Mill., Hb 5,4g %, Thrombo 22 ooo. Im Lumbalpunktat fanden sich massenhaft leukämische Blasten; infolgedessen Stellung der Diagnose einer Meningiosis leukämica.

Zunächst wurde 3 Tage lang mit Puri-Nethol (1oo mg/d) behandelt, dann stellte man bei 12 8oo Leukocyten und 89% Blasten um auf die Kombination Cytosin-arabinosid (2x1oo mg/d) und 6-Thioguanin (4o mg/d). Hier führten wir die unten beschriebenen Untersuchungen durch.
Durch diese Therapie konnten die Leukocyten zwar nach 4 Tagen auf 5 4oo, nach späteren weiteren Therapieintervallen auf 2 9oo und der Blastenanteil nach 5 Wochen auf 72% gesenkt werden, jedoch stellte sich eine ausgeprägte Thrombopenie mit der klinischen Symptomatik von

Fundusblutungen ein, welche zum Abbruch der Behandlung zwangen.

Es kam im therapiefreien Intervall erneut zu einem leukämischen Blastenschub (6o ooo Leukocyten) und nach vergeblichen Versuchen mit Adriamycin und Hostacortin bei 5oo ooo Leukocyten zum Exitus letalis, 4 Monate nach Beginn mit Cytosinarabinosid und 6-Thioguanin.

3. Geh.H., 32 Jahre, ♀: Akute Myeloblastenleukämie

Anlässlich eines stationären Aufenthaltes in einem auswärtigen Krankenhaus wurde die Diagnose einer akuten Leukämie gestellt. Die Patientin fühlte sich zu dieser Zeit sehr leistungsschwach und appetitlos. Man begann mit einer zytostatischen Therapie, die auch in einer psychiatrischen Klinik, in die die Patientin wegen eines organischen Psychosyndroms eingewiesen wurde, weitergeführt wurde. Die Aufnahme hier in die Med. Klinik erfolgte 3 1/2 Monate später bereits in einem präfinalen Stadium.

Befund bei Klinikaufnahme:

Petechiale Blutungen im Bereich der Schleimhaut und der beiden Unterschenkel, Gingiva-Hyperplasie, Mikulicz-Syndrom, conjunktivale Blutungen. Leber 2 QF vergrößert, Milz tastbar etwa 4 cm unterhalb des Rippenbogens von ausgesprochen derber Konsistenz. Lymphknoten vergrößert beidseitig submandibulär, in lateraler Halsregion, axillär, inguinal. Leuko 51 3oo, Blasten 55%, Hb 5,4g %, Ery 1,7 Mill., Thrombo 38 ooo. Sternalpunktat: R/W stark erniedrigt (2/1oo), fast nur Blasten. Versucht wurde noch eine Therapie 4 Tage nach Aufnahme, bei 19 7oo Leukocyten und 77% Blasten, einen Tag lang mit 2 x 6o mg Cytosin-arabinosid und 25 mg 6-Thioguanin. Zwei Tage darauf verstarb die Patientin. Die Leukocyten waren auf 24 5oo, der Blastenanteil nach einem Tag auf 85% angestiegen.

Unsere Untersuchungen bezogen sich auf die Cytosin-arabinosidwirkungen.

4. Bau. Eu., 58 Jahre, ♂: Akute Promyelocytenleukämie

Aus völliger Gesundheit heraus, ausgenommen einer chronischen Herzinsuffizienz, erkrankte der Patient 1 Woche vor Einweisung in ein auswärtiges Krankenhaus hochfieberhaft mit Temperaturen bis 4o,5° C. Dort wurde zunächst eine Leukopenie, dann eine Leukocytose mit schwerer Linksverschiebung festgestellt. Die Verlegung in die Med. Klinik erfolgte 3 Wochen danach. Befund bei Klinikaufnahme:

Soorbefall an Wangenschleimhaut, Petechien auf Abdomen, rechts im Bereich Th 1o-12 Zustand nach Herpes zoster. Leber 18 cm breit. Milz nicht tastbar. Lymphknoten beidseitig vergrössert axillär, cubital, inguinal. Leuko 23 4oo, Blasten 85%, Hb 8,7g %, Ery 2,2 Mill., Thrombo 6o ooo. Sternalpunktat: R/W stark erniedrigt (3/1oo), 87% Blasten.

Begonnen wurde mit einer Ultralanbehandlung über 5 Tage. Darunter stiegen die Leukocyten auf 38 2oo und die Blasten auf 97%. Hier wurde eine Therapie mit Cytosin-arabinosid (2 x 9o mg/d) und 6-Thioguanin (4o mg/d) angeschlossen und 3 Tage lang beibehalten. Nach 3 Tagen waren die Leukocyten bereits auf 4 ooo und die Blasten auf 67% gefallen. Leider konnte diese Therapie nicht fortgesetzt werden. Auf dem Boden einer Lungenembolie, die am gleichen Tag auftrat, als mit Cytosin-arabinosid begonnen wurde, entwickelte sich eine beidseitige Herzinsuffizienz, die 3 Wochen nach Klinikaufnahme den Tod des Patienten im Gefolge hatte.

5. Böt.G., 63 Jahre ♂: Akute Promyelocytenleukämie

3 Monate vor Aufnahme in die Med. Klinik zeigte der Patient uncharakteristische Symptome wie Müdigkeit und Ab-

geschlagenheit. Es entwickelte sich zunehmend eine hämorrhagische Diathese mit Nasenbluten und petechialen Blutungen im Bereich beider Unterschenkel. Deshalb Einweisung in die Med. Klinik.

Befund bei Klinikaufnahme:

Leber nicht tastbar, ebenso nicht die Milz und die Lymphknoten. Leuko 73 5oo, Blasten 68%, Hb 13,3g %, Ery 4,4 Mill., Thrombo 5 ooo. Sternalpunktat: R/W erniedrigt (11/1oo).

Als Therapie wurde versucht, eine Synchronisation mit Hydroxyurea zu erreichen, und anschliessend mit Cytosin-arabinosid zu behandeln. Hierzu wurde Hydroxyurea in einer Testdosis von 7g verabreicht und im Anschluss seine Abklingquote bestimmt. 2 Tage darauf gab man Cytosin-arabinosid (2 x 1oo mg). 3 Tage danach - die Leukocyten waren mittlerweile auf 42 5oo gesunken, die Blasten lagen bei 71% - begann man nun mit der eigentlichen Synchronisationstherapie.

In der Absicht, die Zykluszellen unter einen 36-stündigen Hydroxyureablock zu setzen, applizierte man Hydroxyurea in Dosen von zunächst 7 und anschließend 3 x 3,5g in jeweils 8-Stunden Abständen. Mit Cytosin-arabinosid (2x1oo mg/d) sollten nun 16 Stunden nach der letzten Hydroxyurea-Gabe die entblockten Zykluszellen in der S-Phase erfaßt werden.

Unsere Untersuchungen beziehen sich auf die Vorgänge in diesem Therapieabschnitt.

3 Tage nach Cytosin-arabinosid waren die Leukocyten auf 1o 3oo, der Blastenanteil auf 56% gefallen. Cytosin-arabinosid wurde gleich nach dem ersten Tag gestoppt, weil die Leukocyten um mehr als die Hälfte gesunken waren.

In der Folgezeit wiederholte man die Synchronisation mit Hydroxyurea und gelang so zu Leukocytenwerten um 3 ooo.

Nach weiteren Therapieversuchen mit Cytosin-arabinosid, 6-Thioguanin und Adriamycin besserte sich das Krankheitsbild so, daß der Patient 2 Monate nach Klinikeinweisung vorübergehend entlassen werden konnte (Leukocyten 2 3oo,26% Blasten). Die Parameter einer Teilremission waren allerdings noch nicht erfüllt.

Wenige Wochen darauf folgte ein neuer Blastenschub, Reinduktionsversuche mit Cytosin-arabinosid und Adriamycin konnten den Tod 4 Monate nach der Erstaufnahme in die Med. Klinik nicht aufhalten.

6. Bar. Er., 43 Jahre, ♂: Lymphoidzellige Reticulose

Als Erstsymptome traten 4 Jahre vor der letzten Aufnahme in die Med. Klinik bei dem Patienten petechiale Blutungen an den mechanisch belasteten Hautstellen auf. Leber und Milz vergrösserten sich. Die Milz reichte schliesslich bis ins kleine Becken. Eine Endoxanbehandlung war erfolglos. Eine Milzbestrahlung vermochte die Tumorgrösse zu reduzieren. 3 Jahre lang sprach der Patient auf diese Strahlenbehandlung an, 1-2 mal pro Jahr musste er deshalb stationär in die Klinik aufgenommen werden.

Seit einem Jahr konnten die durch den grossen Milztumor bedingten schweren Allgemeinerscheinungen nur noch durch eine zytostatische Kombinationstherapie zurückgehalten werden. Der Patient erhielt Endoxan, Vincristin, Natulan und Steroide. Im Intervall wurde Methotrexat gegeben. Die Leukocyten stiegen jedoch 1o Monate danach auf 2oo ooo und das Allgemeinbefinden verschlechterte sich sehr. Leukeran und Methotrexat zeigten nur noch geringe Wirkungen. Die letzte Aufnahme in die Med. Klinik erfolgte bereits in präfinalem Zustand:

Milztumorschmerzen, multiple Hämatome, Leber 18 cm breit, Milz 18 cm unter dem Rippenbogen, Lymphknoten

beidseitig vergrössert inguinal. Leuko 12o ooo,99% Reticulumzellen, Hb 8g %, Ery 2,4 Mill., Thrombo 25 ooo.

Mit einer Methotrexatgabe von 1oo mg bei 134 ooo Leukocyten im Blut - hierauf beziehen sich unsere Untersuchungen - erreichte man keine Besserung des Leidens mehr (124 ooo Leukocyten nach 3 Tagen). Fünf Tage später starb der Patient.

E ERGEBNISSE

I. Unter Therapie mit Cytosin-arabinosid

4 Patienten wurden mit Ara-C, 2 mal 1,5 mg/kg und Tag jeweils morgens und abends, behandelt.

1. ^{3}H-Thymidinmarkierungsindex

Der ^{3}H-Thymidinindex gibt in unserem Falle an, wieviel ‰ der leukämischen Blasten im peripheren Blut sich in DNS-Synthese befinden. Ausgezählt wurden mindestens 1o ooo Blasten pro Präparat.

Wie Abb. 2 zeigt, erfolgte nach der Injektion von Ara-C ein schneller Abfall der leukämischen Blasten, die ^{3}H-Thymidin markiert sind. Man erkennt, daß die Wirkung des Ara-C unterschiedlich lang andauert. Bei 2 Patienten kam es nach 4 Stunden zu einem Wiederanstieg bis beinahe auf den Ausgangswert, bei einem anderen Patienten stieg der ^{3}H-Thymidinindex nur unmerklich an. Eine vierte Patientin, die präfinal zur Aufnahme kam und auf die Behandlung nicht ansprach, wies einen hohen Markierungsindex auf und ließ nach Ara-C Gabe einen Abfall vermissen.

Wie ist dieses Verhalten des ^{3}H-Thymidinindex zu erklären? Ist es so, daß der Wiederanstieg des ^{3}H-Thymidinindex die Folge ist des Wiedereintritts von nur vorübergehend blockierten S-Phasezellen in den Zyklus oder überwiegend die Folge des Neueinstroms von G_1-Zellen in die S-Phase? Eine Antwort geben die folgenden Untersuchungen.

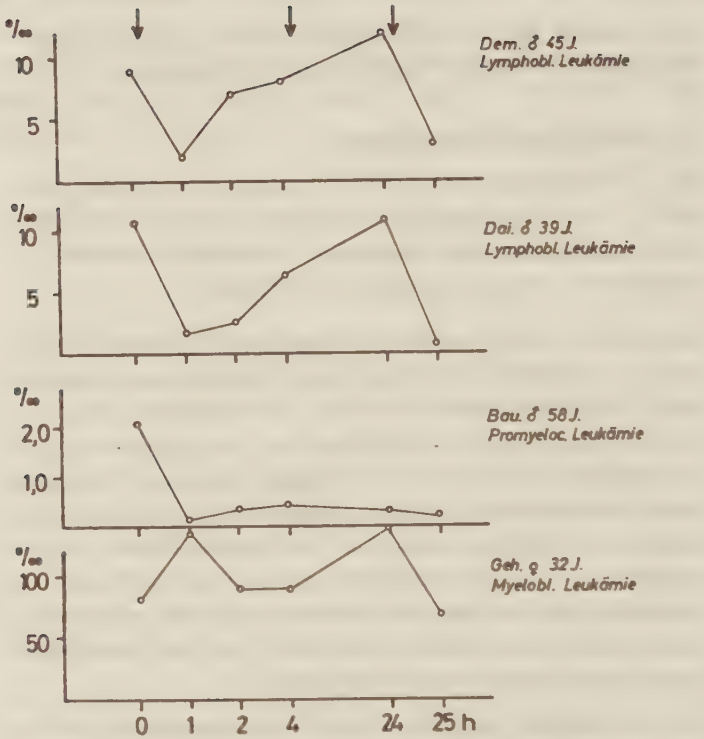

Abb.2

$^{3}_{H}$-Thymidinmarkierungsindex (in ‰ , Ordinate) vor und nach 1,5 mg/kg Cytosin-arabinosid.Ein initialer Abfall des Markierungsindex ist bei allen, außer bei einem Patienten zu sehen. Dieser Patient sprach auf die Behandlung nicht an. Bereits kurze Zeit nach dem Abfall nimmt der Markierungsindex wieder zu.

2. Verteilung der DNS-synthetisierenden Zellen innerhalb der S-Phase

Mit Hilfe der Kombination von Autoradiographie und Feulgenphotometrie an derselben Zelle war es möglich, den DNS-Gehalt von denjenigen Leukämiezellen zu bestimmen, die sich gerade in der Synthesephase des Zellzyklus befinden. Man erhielt so Aufschluß über die Verteilung der S-Phasezellen innerhalb der Synthesephase unter der Therapie.

a) Dem.J., 45 J.
Bei diesem Patienten war der ^{3}H-Thymidinindex kurz nach Ara-C Gabe von 9 auf 2‰ abgefallen und anschließend bald wieder angestiegen. Welche Zellen in der S-Phase sind nun für diesen Wiederanstieg des Anteils der Zellen verantwortlich, der DNS synthetisiert?

Waren die markierten Zellen zum Zeitpunkt vor der Ara-C Gabe über die ganze S-Phase ungefähr gleichmäßig verteilt (Abb.3), so deutet sich bereits 2 Stunden nach der Ara-C Gabe eine Zunahme der markierten Zellen in der ersten Hälfte der S-Phase an. Nach 4 Stunden findet sich eine signifikante ($p<0,05$) Zunahme der markierten Zellen in der frühen S-Phase gegenüber der gleichmäßigen Verteilung der markierten Zellen vor der Ara-C Gabe (Vierfeldertest). Man sieht damit, dass der Wiederanstieg des ^{3}H-Thymidinindex zurückzuführen ist hauptsächlich auf Zellen in der frühen S-Phase, die mit ihrer DNS-Synthese beginnen.

Bei Therapiebeginn mit Ara-C betrug die Zahl der Leukocyten 159 600, einen Tag später 149 000 und nach 4 Tagen nur noch 27 400. Der Anteil der leukämischen Blasten blieb fast unverändert: 96% bei Beginn und 94% 4 Tage nach Ara-C.

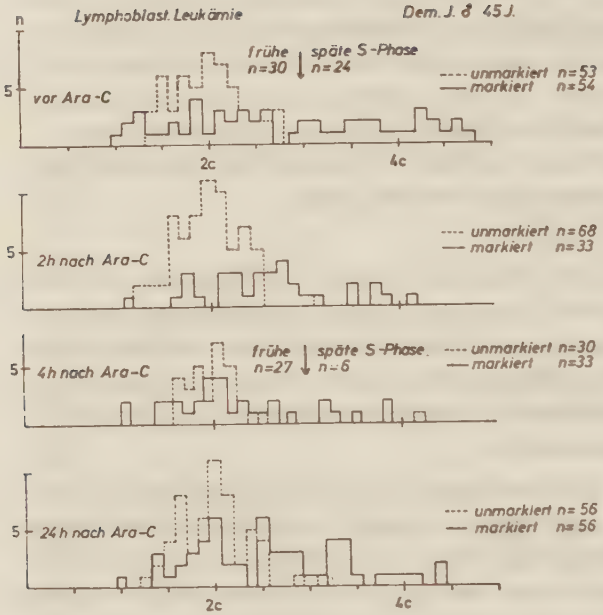

Abb.3

Kombinierte autoradiographische und feulgenphotometrische DNS-Messungen vor und nach Cytosin-arabinosid (Ara-C) bei dem Patienten Dem.J.Ordinate: Zellzahl. Abszisse: DNS-Gehalt der ^{3}H-Thymidinmarkierten Leukämiezellen (-). Zum Vergleich wurde der DNS-Gehalt der nicht markierten Leukämiezellen mitgemessen (---). Die markierten Zellen in der frühen S-Phase nahmen 4 Stunden nach Ara-C signifikant zu.

b) Dai.H., 39 J.

Wie beim eben beschriebenen Patienten war auch in diesem Fall der ^{3}H-Thymidinindex nach dem schnellen initialen Abfall nach der Ara-C Injektion bald wieder angestiegen (Abb.2). Ebenso zeigte sich eine signifikante Zunahme ($p<0,05$) von Zellen in der frühen S-Phase 4 Stunden nach Ara-C Gabe (Abb.4) gegenüber der Zellverteilung vor Ara-C Gabe, wo die synthetisierenden Zellen in der späten S-Phase überwiegten.

Die Leukocyten fielen nach Therapiebeginn mit Ara-C innerhalb von 4 Tagen von 12 800 auf 5 400 ab. Der Anteil der Blasten blieb zunächst unverändert bei 89% und konnte nach weiteren Therapieintervallen mit Ara-C 5 Wochen danach auf 72% gesenkt werden.

c) Geh.H., 32 J.

Eine Zunahme früher S-Phasezellen war auch bei der Patientin Ge. signifikant ($p<0,05$, Abb.4), hier bereits 2 Stunden nach der Gabe von Ara-C, obwohl der ^{3}H-Thymidinindex sich anfänglich sogar erhöht hatte (Abb.2)und nicht den erwarteten initialen Abfall zeigte. 4 Stunden nach Ara-C war die Zunahme früher S-Phasenzellen nicht mehr nachweisbar.

Auch klinisch ließ die Patientin kein Ansprechen auf Ara-C erkennen. Die Leukocyten stiegen innerhalb von 2 Tagen von 19 700 auf 24 500, ebenso der Blastenanteil von 77 auf 85%.

Der fehlende Abfall des ^{3}H-Thymidinindex zeigt, daß die Zellen in ihrer DNS-Synthese nicht oder nur wenig blockiert wurden. Die Zunahme der Zellen in der frühen S-Phase lässt den Schluss zu, daß aber dennoch nach 2 Stunden vermehrt zusätzlich Zellen von der G_1-Phase in die DNS-Synthese eintreten, was eine teilsynchronisierende Wirkung von Ara-C bedeuten würde.

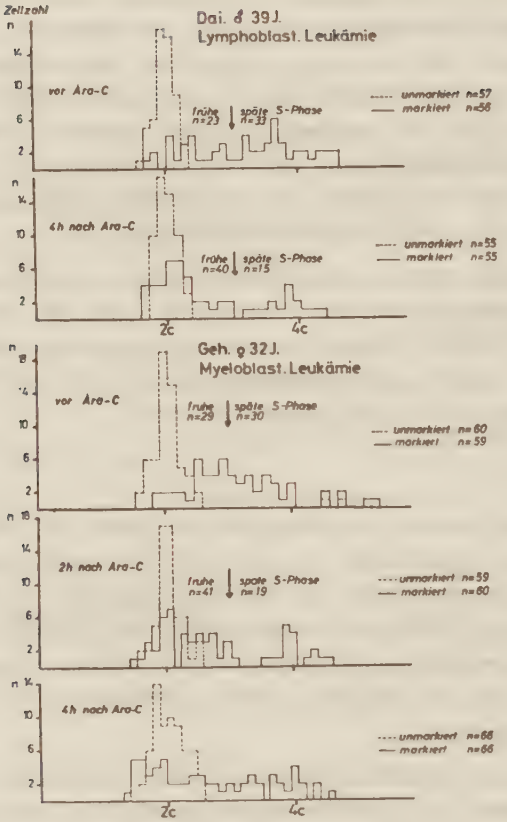

Abb. 4

Kombinierte autoradiographische und feulgenphotometrische DNS-Messungen vor und nach Cytosin-arabinosid (Ara-C) bei den Patienten Dai.H. und Geh.H. Die markierten Zellen in der frühen S-Phase nahmen signifikant zu, bei Dai. 4 Stunden nach Ara-C, und bei Geh. (der Patientin, die nicht ansprach) 2 Stunden nach Ara-C.

II Unter Therapie mit Hydroxyurea und Ara-C

Bei dem Patienten Böt.G., 64 J., wurde versucht, mit Hydroxyurea (Dosierung: 7 und 3 x 3,5 g in jeweils 8-Stunden-Abständen) die Leukämiezellen 36 Stunden lang an der G_1-S Grenze zu arretieren und nach Abklingen der Wirkung synchron in die Synthesephase eintreten zu lassen. Hier wurden die Zellen einen Tag lang Ara-C ausgesetzt, 2 mal 1,5 mg/kg.

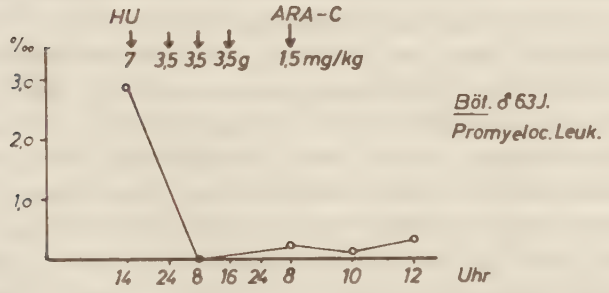

Abb.5

^3_H-Thymidinmarkierungsindex (in ‰, Ordinate) unter der Synchronisation mit Hydroxyurea (HU) und anschliessender Cytosin-arabinosid Gabe (Ara-C) bei dem Patienten Böt. Bei jeder Bestimmung wurden 1o ooo - 2o ooo Zellen ausgezählt. Unter dem Hydroxyureablock fällt der Markierungsindex auf o ab.

Unter diesem Hydroxyureablock sank der ^{3}H-Thymidinmarkierungsindex von 2,9 auf o ‰ (1o ooo Leukämiezellen wurden ausgezählt, Abb.5). Nach Absinken des Wirkspiegels (16 Stunden nach der letzten Hydroxyureagabe) stieg

der ^{3}H-Thymidinindex wieder etwas an. Wodurch ist dieser Anstieg bedingt? Die kombinierten autoradiographischen und feulgenphotometrischen Messungen zeigen (Abb.6), daß fast ausschließlich alle S-Phasenzellen ($p<o,o1$) in der frühen S-Phase anzutreffen sind und dort das leichte Anheben des ^{3}H-Thymidinindex bewirken. Nach Abklingen der Wirkung von Hydroxyurea beginnen also die an der G_1-S Grenze arretierten Leukämiezellen, die DNS-Synthese anzutreten.

Mit Ara-C wurde nun versucht, die Zellen, die nach der Synchronisation durch Hydroxyurea die DNS-Synthese anlaufen, in ihrer Synthese zu hemmen und abzutöten. 2 Stunden nach Ara-C Gabe (Abb.5) sinkt der ^{3}H-Thymidinindex nur sehr gering ab, 4 Stunden danach steigt er wieder ein wenig. Autoradiographie und Feulgenphotometrie zu denselben Zeiten ergeben (Abb.6) daß 2 Stunden nach Ara-C Gabe die S-Phasezellen in der frühen S-Phase signifikant ($p<o,o1$) abgenommen haben gegenüber dem Zeitpunkt vor der Ara-C Injektion, nach dem Hydroxyureablock. Das bedeutet, dass Ara-C die synthetisierenden, sich in der frühen S-Phase befindenden Zellen blockiert.

Nur wenige S-Phasenzellen, die über die gesamte S-Phase ungefähr gleichmäßig verteilt sind, werden durch Ara-C nicht gehemmt und führen die DNS-Synthese weiter (Abb.6, 2 Std. nach Ara-C).

4 Stunden nach Ara-C Gabe findet sich wie bei den oben beschriebenen Fällen wieder eine Zunahme ($p<o,o6$) von S-Phasezellen in der frühen S-Phase, welche durch den vermehrten Einstrom von G_1-Zellen in die S-Phase verursacht sein muß.

Die Leukocyten fielen unter dem Hydroxyureablock von 42 5oo auf 27 8oo. 3 Tage nach Beginn der sich anschliessenden Ara-C Behandlung waren sie weiter auf 1o 3oo ge-

sunken. Der Blastenanteil sank innerhalb derselben Zeit von 71 auf 56%.

Die Beobachtung, dass die in der frühen S-Phase angehäuften S-Zellen von Ara-C blockiert werden (2 Std. nach Ara-C) (Abb.6) ist ein Beweis dafür, dass Ara-C bereits in der ersten Hälfte der S-Phase angreift. Sie schliesst zumindest aus, dass Ara-C isoliert erst gegen Ende der S-Phase zur Wirkung kommt.

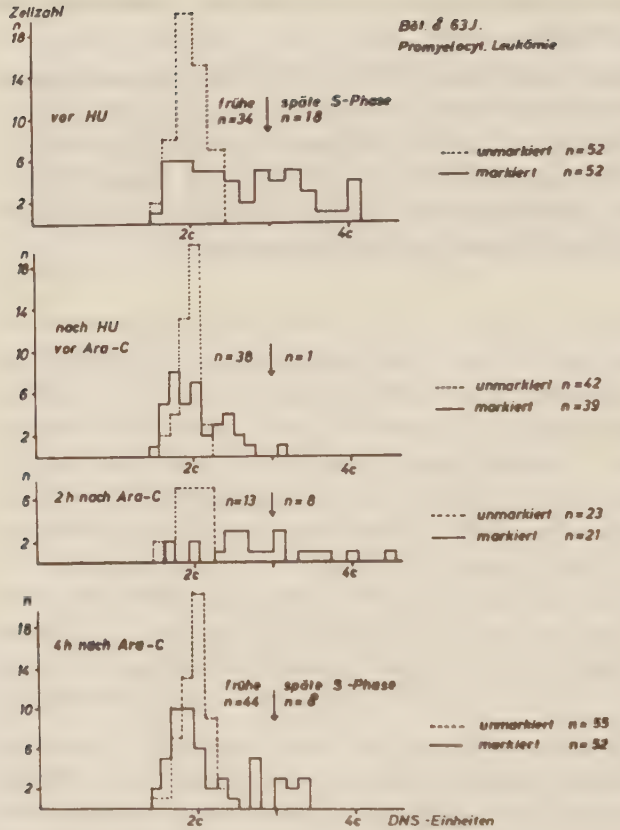

Abb.6

Kombinierte autoradiographische und feulgenphotometrische DNS-Messungen vor und nach Synchronisation mit Hydroxyurea bei dem Pat.Böt. Man erkennt, dass sich nach dem Hydroxyureablock fast alle markierten Leukämiezellen in der frühen S-Phase befinden. 2 Std. nach dem anschließend gegebenen Cytosinarabinosid kam es zu einer signifikanten Abnahme markierter Zellen insbesondere der frühen S-Phase, 4 Std. nach Cytosin-arabinosid zu einer erneuten Zunahme früher S-Phasezellen.

III. Unter Therapie mit Methotrexat

Der Patient Bar. Er., 43 J., wurde im Finalstadium nochmals mit einer Methotrexatinjektion, 1oo mg, behandelt, nachdem er schon mehrere Jahre unter Therapie stand.

Abb.7

$^{3}_{H}$-Thymidinmarkierungsindex (in ‰ Ordinate) vor und nach Methotrexat 1oo mg bei dem Pat.Bar.

Der $^{3}_{H}$-Thymidinindex fiel innerhalb von 2 Stunden nach Methotrexatgabe von 11 auf o,3‰ ab und stieg innerhalb des untersuchten Zeitraumes nicht mehr an. (Abb.7). Im Vergleich zu Ara-C kam hier die DNS-Synthese langsamer zum Erliegen und erholte sich innerhalb von 4 Stunden nicht.

Die kombinierten autoradiographischen und feulgenphotometrischen Messungen (Abb.8) ergaben 4 Stunden nach Methotrexat keine wesentliche Veränderung der S-Phasezellen im Vergleich zur Ausgangskurve. Es kommt hier also innerhalb von 4 Stunden zu keiner signifikanten Zunahme von S-Phasezellen in der frühen S-Phase wie nach Ara-C.

Die Leukocytenzahl sank innerhalb von 4 Tagen nach der Methotrexatgabe von 134ooo auf 124ooo, sie änderte sich damit praktisch nicht.

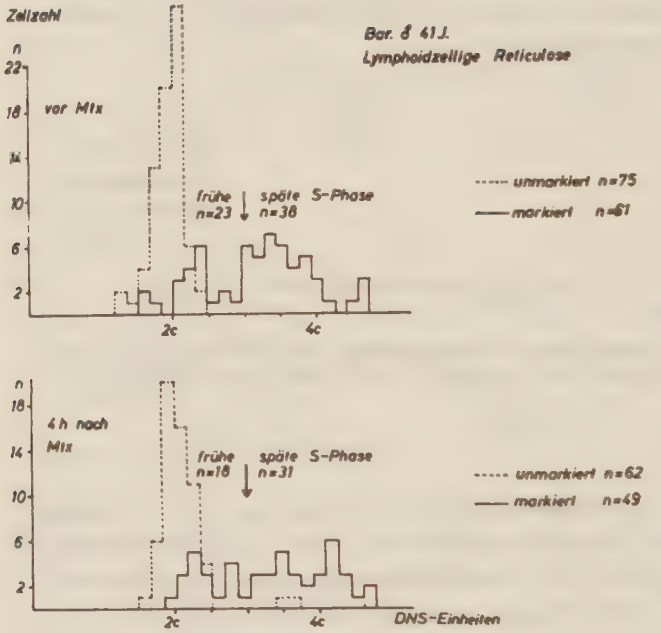

Abb. 8

Kombinierte autoradiographische und feulgenphotometrische DNS-Messungen vor und nach Methotrexat (Mtx) bei dem Pat. Bar. Es sind keine wesentlichen Änderungen in der Verteilung der S-Phasezellen nach Methotrexat zu erkennen.

F D I S K U S S I O N

I. Cytosin-arabinosid

Die Abnahme der ^{3}H-Thymidinmarkierten Blasten nach Ara-C Gabe korreliert mit einer Verminderung der Einbauraten von den DNS-Vorstufen ^{3}H-Thymidin und ^{3}H-Desoxyuridin. Das wurde schon berichtet von Lampkin et al. 1969 (17), von Karon und Shirakawa bei leukämischen Knochenmarkszellen 197o (14) und von Brehaut und Fitzgerald in Zellkulturen 1968 (1).

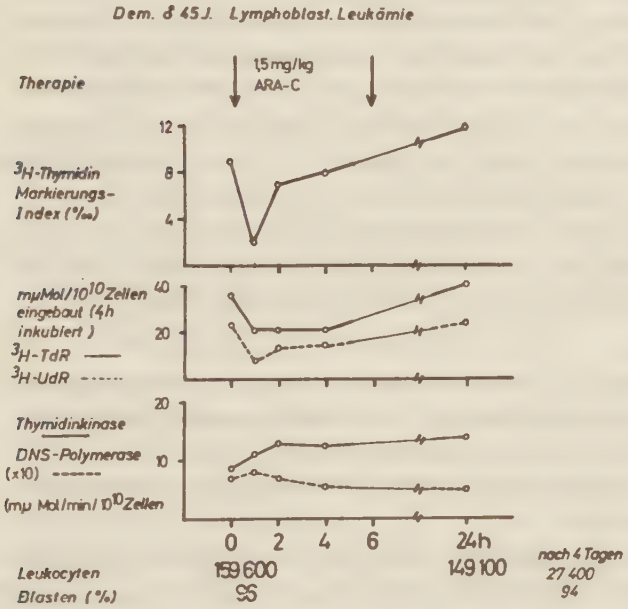

Abb.9

^{3}H-Thymidinmarkierungsindex und biochemische Untersuchungen unter Behandlung mit Cytosin-arabinosid (Ara-C) bei Dem.J.Nach einem anfänglichen Abfall steigt der Markierungsindex bald wieder an, während die Einbauraten der DNS-Vorstufen noch niedrig bleiben. ^{3}H-TdR und ^{3}H-UdR: Einbauraten der DNS-Vorstufen ^{3}H-Thymidin und ^{3}H-Desoxyuridin.

In parallel zu den unseren angelegten Untersuchungen hat Wilmanns[+)] an denselben Patienten festgestellt,daß die Einbauraten nach Ara-C Injektion ebenfalls absinken, was nach Abb.1 auch verständlich ist. In Abb.9 sind die biochemischen Zellparameter[+)] bei dem Pat. Dem.J., 45 J., dem ^{3}H-Thymidinindex gegenübergestellt. Man erkennt, dass 2 Stunden nach Ara-C Gabe der ^{3}H-Thymidinindex wieder ansteigt. Dies kann zunächst so interpretiert werden, dass ein Teil der durch Ara-C blockierten Blasten die DNS-Synthese wieder aufnimmt.

Die kombinierten autoradiographischen und feulgenphotometrischen Messungen konnten jedoch zeigen, dass 4 Stunden nach der Gabe von Ara-C vornehmlich Zellen in der frühen S-Phase DNS synthetisieren, dass diese Zellen in der frühen S-Phase innerhalb von 4 Stunden nach dem Ara-C Block zunehmen und zu dem Wiederanstieg des ^{3}H-Thymidinmarkierungsindex führen. Diese Zellen in der frühen S-Phase müssen nach der Ara-C Gabe vermehrt von der G_1 in die S-Phase getreten sein und hier die Zellzunahme in der ersten S-Phasenhälfte verursachen.

Die primär von Ara-C in der S-Phase gehemmten Zellen nehmen die DNS-Synthese zum überwiegenden Teil nicht wieder auf, sondern gehen zugrunde, was an dem in der Folgezeit zu beobachtenden rapiden Leukocytenabfall zu sehen ist.
Die Befunde sprechen nicht für eine isolierte Hemmung der späten S-Phasezellen durch Ara-C, worauf unten noch näher eingegangen wird.

Währenddessen bleiben die Einbauraten von ^{3}H-Thymidin und ^{3}H-Desoxyuridin noch niedrig. Davon kann abgeleitet werden, dass die DNS-Synthese verlangsamt abläuft.

[+)] Herrn Prof.Wilmanns,Med.Klinik Tübingen, danke ich für die Überlassung der Befunde.

Die Einbauraten stellen nämlich ein Mass für die Gesamt-DNS-Neubildung dar, während der ^{3}H-Thymidinindex angibt, auf wieviele Zellen sich die DNS-Neubildung verteilt.

Die Diskrepanz zwischen Markierungsindex und Einbauraten zeigt sich auch bei der Patientin Geh.H., die nicht auf die Behandlung ansprach. Trotz eines erhöhten Markierungsindex nach Ara-C sind die Einbauraten erniedrigt. Die Zellen scheinen also gemäß dem hohen Markierungsindex in ihrer DNS-Synthese nicht vollständig gehemmt zu werden, nur ihre Synthesegeschwindigkeit ist reduziert. Dennoch strömen nach 2 Stunden vermehrt Zellen von der G_1- in die S-Phase ein, was einem Teilsynchronisationseffekt von Ara-C entspricht.

Auch in vitro Untersuchungen von Müller und Wilmanns[+)] deuten darauf hin, dass Ara-C in niedrigen Konzentrationen, entsprechend einem therapieresistenten Patienten, die DNS-Synthese in der Einzelzelle nur verzögert und eine partielle Zellsynchronisation verursacht, in höheren Konzentrationen dagegen die DNS-Synthese in den einzelnen Zellen zum Stoppen bringt.

Eine Zunahme DNS-synthetisierender Zellen 2 Tage nach Medikamentengabe hatten auch Lampkin und Mitarbeiter 1969 beobachtet (17). Sie vermuteten eine partielle Synchronisation der leukämischen Zellpopulation unter dem Einfluss von Ara-C.

Gegen die Annahme einer selektiven Schädigung der Zellen im zweiten Teil der S-Phase, wie sie von Karon und Shirakawa 197o in Fibroblastenkulturen von Hamstern (14)

+) unpubliziert; Med.Klinik Tübingen.

vermutet wurde, sprechen die biochemischen Angriffspunkte von Ara-C sowie die im Vergleich zum ^{3}H-Thymidinindex verzögert eintretende Abnahme der Zellen im zweiten Teil der S-Phase , wie die vergleichenden ^{3}H-Thymidin- und feulgenphotometrischen Untersuchungen insbesondere bei dem Patienten Dem. zeigen (Abb.3). Außerdem spricht dagegen die vorher erwähnte Beobachtung, dass bei dem Patienten Böt., (bei dem die Synchronisation mit Hydroxyurea vorgenommen wurde), die im ersten Teil der S-Phase angehäuften Zellen von Ara-C erfasst werden (2 Std. nach Ara-C, Abb.6).

Die geschilderten Befunde machen folgende Veränderungen im Zellzyklus unter der Behandlung mit Ara-C wahrscheinlich:

1. Ara-C bewirkt 1-2 Stunden nach Injektion eine maximale Hemmung oder Verlangsamung der DNS-Synthese.
2. Die DNS-Synthese kommt wieder in Gang bereits 2-4 Stunden nach Ara-C Gabe. Dies ist hauptsächlich eine Folge des vermehrten Einstroms von Zellen aus der G_1- in die S-Phase und nicht die Folge der Wiederaufnahme der DNS-Synthese in primär von Ara-C blockierten S-Phasezellen.

Es kann vermutet werden, dass dieser partielle Synchronisationseffekt sich therapeutisch ausnutzen läßt, wenn man Ara-C in 4-6 Stunden Abständen wiederholt injiziert. Während dieses Zeitraumes ist eine beträchtliche Zahl von Zellen in die frühe S-Phase getreten.

3. Ein starker Leukocytenabfall in den folgenden Tagen ist der Erfolg einer wirksamen S-Phasen-spezifischen Therapie. Eine Erklärung für diese Tatsache ist eine dauernde Blockade von Zellen, die unter dem Einfluß von Ara-C von der G_1- in die S-Phase strömen. Dadurch wird das Verhältnis von G_o- zu Zykluszellen geändert.

Die Folge dessen dürfte ein vermehrtes Nachströmen von G_o-Zellen in den Pool von Zykluszellen sein.

Es könnten somit auch G_o-Zellen von Ara-C zerstört werden, nachdem sie von G_o über G_1 in die S-Phase gekommen sind. Dies kann eine Erklärung sein für die Zerstörung eines grossen Anteils von Blasten durch eine primär S-Phasen-spezifische Ara-C Therapie.

II. Hydroxyurea und Cytosin-arabinosid

Wenn man die Befunde der kombinierten autoradiographischen und photometrischen Untersuchungen für sich allein betrachtet, dann scheint die Synchronisation mit Hydroxyurea gut gelungen zu sein. Denn fast alle Zellen, die nach dem Absinken von Hydroxyurea DNS synthetisieren, finden sich in der frühen S-Phase (Abb.6). Allerdings steigt zum selben Zeitpunkt der ^{3}H-Thymidinindex nur sehr gering an, was bedeutet, dass nach dem Hydroxyureablock relativ wenige Zellen synchron die Synthesephase anlaufen.

Vielleicht hatten hier die Zellen noch nicht genügend Zeit, um sich aus ihrer Arretierung an der G_1-S Grenze zu befreien, obwohl Hydroxyurea bereits unter seinen Wirkspiegel gefallen war. So ist es denkbar, dass der ^{3}H-Thymidinindex noch weiter angestiegen wäre, wenn man mit der Ara-C Injektion noch einige Stunden gewartet hätte.

Nach der sich der Synchronisation anschliessenden Ara-C Gabe scheinen sich dieselben Vorgänge abzuspielen, wie sie vorher bei den Patienten ohne Synchronisation mit Hydroxyurea geschildert wurden, nämlich daß 4 Stunden nach Ara-C Gabe ebenfalls erneut Zel-

len von der G_1 in die S-Phase einströmen, nachdem die zuvor in der S-Phase befindlichen Zellen von Ara-C erfasst worden sind.

III. Methotrexat

Nach Methotrexat kommt die DNS-Synthese langsamer zum Erliegen als nach Ara-C bei Betrachtung des ^3_H-Thymidinindex. Während des untersuchten Zeitraumes von 4 Stunden nehmen keine blockierten S-Phasezellen die DNS-Synthese wieder auf, noch treten Zellen im Anschluß nach Methotrexat vermehrt von der G_1 in die S-Phase ein.

G. ZUSAMMENFASSUNG

Mit Hilfe einer kombinierten autoradiographischen und feulgenphotometrischen Untersuchungstechnik war es möglich, sich eine Vorstellung darüber zu verschaffen, wie leukämische S-Phasezellen innerhalb der DNS-Synthesephase verteilt sind. Dabei interessierte im Besonderen, inwieweit es unter einer Therapie mit Ara-C, Hydroxyurea oder Methotrexat zu einer Änderung in der Verteilung von S-Phasezellen innerhalb der S-Phase kommt. Im Zusammenhang mit dem ^{3}H-Thymidinmarkierungsindex liessen sich folgende Rückschlüsse ziehen:

Ara-C bewirkt 1-2 Stunden nach Injektion eine maximale Hemmung oder Verlangsamung der DNS-Synthese. Der ^{3}H-Thymidinindex fällt nach 1 Stunde ab und steigt nach 2 Stunden wieder an. Die DNS-Synthese kommt bereits 2-4 Stunden nach Ara-C Gabe wieder in Gang infolge eines vermehrten Einstroms von Zellen aus der G_1- in die S-Phase. Dieser Vorgang läßt weiter schließen auf ein Nachströmen von G_o-Zellen in den Pool von Zykluszellen, in Zusammenhang mit der Tatsache, daß die Zahl der Leukämiezellen innerhalb kurzer Zeit nach Beginn einer Ara-C Therapie stark zurückgeht.

Hydroxyurea entläßt nach Abklingen seiner Wirkung die an der G_1-S Grenze angehäuften Zellen aus ihrem Block. Das anschließend gegebene Ara-C vermag die entblockten Zellen in ihrer DNS-Synthese zu stören und verursacht, wie nach alleiniger Ara-C Gabe, nach 4 Stunden ein vermehrtes Eintreten von G_1-Zellen in die S-Phase.

In einem Falle, bei dem Ara-C klinisch nicht ansprach, kam es nach Ara-C Gabe nur zu einer Verlangsamung der DNS-Synthese, aber dennoch zu einem vermehrten Einstrom von G_1-Zellen in die S-Phase.

Nach Ara-C kommt es nicht zu einer selektiven Hemmung von Zellen in der späten S-Phase.

Nach Methotrexat liess sich eine zunehmende Hemmung der DNS-Synthese erkennen, die über den untersuchten Zeitraum von 4 Stunden andauerte.

H. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. BREHAUT L.A.AND FITZGERALD P.H. — The Effects of Cytosine Arabinoside on the Cell Cycle of Cultured Human Leuk.:A Microdensitometric and Autoradiographic Study.Cell tissue kinet.1,147-152 (1968)

2. BARKA, T., ADERSON,P.J. — Histochemistry, Harper and Row, New York 1963

3. BOCK,H.E., HARTJE,J. MÜLLER,D.,WILLMANNS,W. — Thymidinnucleotidsynthese u. Proliferation von Knochenmarkszellen bei megaloblastären Anämien unter der Einwirkung von Vit.B_{12} Klin.Wschr.45, 176 (1967)

4. CASPERSSON, T. — Über den chemischen Aufbau der Strukturen des Zellkerns Scand.Arch.physiol.73 Suppl.8 (1936)

5. CHU, M.Y. AND FISCHER, G.A. — A proposed mechanism of action of 1-beta-D-arabinofuranosyl-cytosine as an inhibitor of the growth of leucemic cells. Biochem.Pharmacol.11, 423 (1962)

6. CRATHORN, A.R.,AND K.V.SHOOTER — Uptake of thymidine and synthesis of desoxyribonucleic acid in mouse ascites cells. Nature.(London)187,614 (196o)

7. DAVIDSON,J.N. — The biochemistry of nucleic acids.Methuen u.CA.Ltd.87 (196o)

8. FABRICIUS,E.,AND RAJEWSKY,M.F. — Determination of Hydroxyurea in Mammalian Tissues and Blood. European Journal of Clinical and Biological Research 16, 679-683 (1971

9. FEULGEN,R.UND H. ROSENBECK
Mikroskopisch chemischer Nachweis einer Nucleinsäure vom Typus der Thymonucleinsäure und die darauf beruhende elektive Färbung von Zellkernen in mikroskopischen Präparaten.
Z.physiolog.Chem.135 2o3-248 (1924)

10. FURTH,JJ.,AND COHEN, S.S.
Inhibition of Mammalian DNA Polymerase by the 5' Triphosphate of 1-ß-D-Arabinofuranosylcytosine and the 5'-Triphosphate of 9-ß-D-Arabinofuranosyladenine.
Cancer Res.28, 2o61 (1968)

11. GOODMAN,LOUIS S.,AND GILMAN, ALFRED
The Pharmacological Basis of Therapeutics. 4.Edition,The Maximillian Company,New York S.1381 (197o)

12. GROSS,R.
Entwicklungen und Probleme der cytostatischen Chemotherapie, 1.Zusatzheft,Internist, 1o9-115 (1971)

13. HARBERS, E.
Nucleinsäuren.Biochemie und Funktionen
Stuttgart: G.Thieme (1969)

14. KARON,M., AND SHIRAKAWA, Sh.
Effect of 1-ß-D-Arabinofuranosylcytosine on Cell Cycle Passage Time.
J.Nat.Cancer Inst.45,861-867 (197o)

15. KILLMANN,S.A.
Proliferative activity of blast cells in leucemia and myelofibrosis. Acta med. scand. 178, 263 (1965)

16. KRAKOFF,I.H.,BROWN,N.C., AND REICHARD,P.
Inhibition of ribinucleoside diphoshate reductase by hydroxyurea.
Cancer Res.,28,1559-1565 (1968)

17. LAMPKIN,B.C.,NAGAO,T. AND MAUER,A. Drug Effect in Acute Leukemia. J.clin.Invest.48,1124 (1969)

18. LANGEN,P. Antimetabolite des Nucleinsäurestoffwechsels Berlin: Akademie Verlag 1968

19. LEUCHTENBERGER,C. Quantitative Determination of DNA in Cells by Feulgen Microspectrophotometry. In: General Cytochemicals Methods I, 219-23o (1958) Edited by I.F.Danielli,Academic Press Inc.,Publishers

20. MAUER,A.M.,FISCHER,V. Comparison of the proliferative capacity of leucemic cells in bone marrow and blood. Nature. (London)193,1o85 (1962)

21. MÜLLER, D. Studium der Proliferationsdynamik von Blutzellen mit Hilfe cytophotometrischer DNS-Bestimmungen in der Einzelzelle. Klin.Wschr. 44 174 (1966)

22. MÜLLER,D. Erfahrungen mit der Feulgenfärbung für quantitative cytochemische DNS-Untersuchungen Histochemie 7,96-1o2 (1966)

23. PHILIPS,F.S.,STERNBERG S.S.,SCHWARTZ,H.S., CRONIN, A.P.,SÖDERGEN, J.E., AND vidal,P.M. Hydroxyurea I.Acute Cell Death in Proliferating Tissues in Rats. Cancer Res. 27,61 (1967)

24 POTTER,R.L.,: In The Kinetics of cellular proliferation (ed.F.Stohlman jr) P.113 New York: Grune und Stratton (1959)

2 . RAJEWSKY,M.F. Synchronisation in vivo: Kinetics of Normal and Malignant Populations Following Blockade of DNA Synthesis with Hydroxyurea.

Abstr.IInd meeting European study group for cell proliferation (ESGCP),Schloss Reisensburg Germany Oct. 2-4,1968

26.RAJEWSKY,M.F. Synchronisation in vivo:Kinetics of a malignant cell system following temporary inhibition of DNA synthesis with hydroxyurea. Exp.Cell.Res.60,269 (197o)

27.RAJEWSKY,M.F. E.FABRICIUS,AND D.F.HÜLSER Synchronisation in vivo:Temporary inhibition of DNA synthesis in the rat embryo with hydroxyurea Exp.Cell Res.66,489-492, Jun.1971

28.RAJEWSKY,M.F., HÜLSER, D.F., AND FABRICIUS, E. Untersuchungen zur Synchronisation in vivo: Inhibition der DNA-Synthese durch Hydroxyharnstoff in normalen und malignen Säugerzellsystemen. Z.Krebsforschung 76,266-292 (1971)

29.RIS,H.A.E.MIRSKY Quantitative cytochemical determination of desoxyribinuclein acid with the Feulgen nuclear reaction. Z.gen.Physiolog.33, 125 (1949)

3O.ROSENKRANZ,H.S.,POLLAK, R.D., AND SCHMIDT,R.M. Biological Effects of Isohydroxyurea.Cancer res.29, 2o9 (1969)

31.SKOOG,L.,AND NORDENSKJÖLD,P. Effects of Hydroxyurea and 1-ß-D-Arabinofuranosylcytosine on Desoxyribonucleotide Pools in Mouse Embryo Cells. Europ.J.of Biochem.19,81-89(1971)

32.STOHLMAN JR.F. In: The kinetics of cellular proliferation (ed.F.Stohlmann jr.) P. 318 New York: Grune and Stratton (1959)

33.WILMANNS,W. Kompetitive Enzymmechanismen bei der Therapie von Hämoblastosen mit Antimetaboliten. Verh.dtsch.Ges.inn.Med.74,822 (1968)

34.WILMANNS,W. Antimetabolite. Internist 12,127 (1971)

35.WILMANNS,W.,HARTJE,J. Autoradiographische und enzymchemische Untersuchungen der DNS-Synthese in Leukämiezellen. II.Thymidinkinase und ^{3}H-Thymidin-Markierungsindex unter cytostatischer Therapie. Klin.Wschr.48,788(197o)

36.WILLMANNS,W.UND KEHR,D. DNS-Synthese in Leukämiezellen unter der Einwirkung von Methotrexat, 5-Fluoruracil und Cytosin-Arabinosid in vitro. Pharmacol.clin.2, 161 (197o)

37.WILMANNS,W.,MAINZER,K. MÜLLER,D.,TALKE,H. HENNEKEUSER,H.H. Zur Behandlung akuter Leukämien mit Cytosin-arabinosid. Dtsch.med.Wschr.52,25o9-2516 (1968)

38.YARBRO,J.W. Further studies on the mechanism of action of hydroxyurea. Cancer Res.28,1o82-1o87 (1968)

39.YOUNG,C.W.SCHOCHETMAN, G.HODAS,S.,AND BALIS, M.E. Inhibition of DNA synthesis by hydroxyurea:structure-activity relationships

Cancer Res.27, 535-54o (1967)

Herrn Oberarzt Dozent Dr. Dieter Müller möchte ich
für die Überlassung des Themas und die freundliche
Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit danken.

Mein Dank gilt auch Frl. Boll und Frau Lebherz für
Einweisung in die Methodik der Feulgen-Zytophotometrie.

L E B E N S L A U F

Am 15.6.1949 wurde ich, Josef G l a t t h a a r , als Sohn des Ofensetzermeisters Fritz Glatthaar und seiner Frau Theresia, geb. Hettrich, in Oberndorf am Neckar geboren.

Nach dem Besuch der Grundschule in Oberndorf trat ich 1960 in das dortige Progymnasium ein. 1966 wechselte ich über in das Gymnasium Horb / Neckar und legte hier 1968 das Abitur ab.

Seither studiere ich in Tübingen Medizin. Das Vorphy= sikum bestand ich 1969 und das Physikum 1971. Am 2.8.1974 bestand ich das Medizinische Staatsexamen.